

氏 名（本籍）	ふく しま こう じ 福 島 耕 治
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）
学 位 記 番 号	医 博 第 1 6 4 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 2 年 3 月 2 3 日
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 専 攻	東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科 （ 博 士 課 程 ） 内 科 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	肝細胞癌における p21 ^{waf1/cip1} 発現低下に關与する因子の検討

（ 主 査 ）

論 文 審 査 委 員	教 授 豊 田 隆 謙	教 授 林 富
	教 授 堀 井 明	

論文内容要旨

【背景・目的】

Cyclin dependent kinase inhibitor p21^{waf1/cip1} (以下 p21^{waf1}) は細胞周期調節に重要な役割を担っており、発癌および癌の進展に関与していると考えられる。肝細胞癌における p21^{waf1} 発現レベルは過去の報告により異なる。最近 p21^{waf1} 蛋白発現を転写後制御する因子として p16^{INK4a} が報告された。今回肝細胞癌の p21^{waf1} 発現と、これの発現制御に関与する因子を同一臨床検体にて検討した。

【結 果】

Western blot による検討では肝細胞癌部では背景肝と比較し、22 例中 19 例 (86%) に p21^{waf1} 蛋白発現の低下を認めた。22 例中 11 例 (50%) では発現を認めなかった。検討症例全体では p21^{waf1} 蛋白発現量が有意に癌部で低下していた ($p=0.0003$)。p16^{INK4a} 蛋白は 21 例中 18 例 (86%) で低下し、全体として有意に低下していた ($p=0.0215$)。21 例中 10 例 (48%) では発現を認めなかった。RT-PCR 法による検討では p21^{waf1}mRNA は 23 例中 4 例 (17%) で発現していなかった。22 例中 8 例 (36%) で p21^{waf1}mRNA が発現し、蛋白は発現していなかった。この 8 例全例で p16^{INK4a} 蛋白の発現が認められなかった。p21^{waf1} 蛋白発現量は p16^{INK4a} 蛋白発現量と比較的強い相関を認めた (癌部 ; $r=0.765$, $p<0.0001$, 背景肝 ; $r=0.638$, $p=0.0018$)。direct sequence の結果, p21^{waf1}mRNA が認められなかった症例 4 例中 1 例で p53 exon5-8 の遺伝子変異を伴っていた。検討症例全体では p53 遺伝子変異を 36 例中 6 例に認めた (17%)。p73 exon1-13 の検討では polymorphism を 36 例中 28 例に認めた。p73 mRNA は 23 例全例で癌部, 背景肝とも発現を認めた。p63 mRNA は検討した 23 例全例で癌部, 背景肝ともに RT-PCR 法で認められなかった。Methylation Specific PCR によるメチル化頻度の検討では p16^{INK4a} 5' プロモーター CpG 領域のメチル化は背景肝と比較し、癌部において高頻度に認めた ($p=0.0038$)。p16^{INK4a} 5' プロモーター CpG 領域のメチル化に伴って p16^{INK4a} 蛋白, p21^{waf1} 蛋白発現の低下を認めた。組織学的分化度に関する検討では, p21^{waf1}, p16^{INK4a} 各蛋白発現量が高分化群に比し中分化群で有意に低下していた (p21^{waf1} : $p=0.0305$, p16^{INK4a} : $p=0.0317$)。腫瘍径と各因子発現量についての相関検定では, 腫瘍径と p21^{waf1} 発現量との間に有意な負の相関が認められた ($p=0.0278$, $n=19$, $\rho=-0.519$)。

【結 論】

p21^{waf1} 蛋白発現量は p53 遺伝子異常を有する肝細胞癌組織で低下していたが、p53 遺伝子異常を伴わない癌組織でも低下が認められた。p73, p63 の検討では p21^{waf1} 蛋白発現低下への関与は認められなかった。p21^{waf1} 蛋白は癌の進行に伴いその発現低下が認められた。一部の症例では p21^{waf1}mRNA 発現を認めたが、p21^{waf1} 蛋白は認められなかった。これらの症例では p16^{INK4a} 蛋白が認められなかった。さらに肝細胞癌における p16^{INK4a} 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が p16^{INK4a} 蛋白発現量を規定していると考えられたため、間接的に p21^{waf1} 蛋白発現の低下に関与しているものと考えられた。

審査結果の要旨

肝細胞癌における特異的な遺伝子異常は現在まで明らかにされていない。本論文においては肝細胞癌での細胞周期調節の異常に関与する因子を cyclin dependent kinase (CDK) である p21^{waf1/cip1} を主軸に検討した。p21^{waf1/cip1} は p53 から直接的に誘導され、G1 arrest を誘導するため、修飾因子により影響される p53 からのシグナルを p21^{waf1/cip1} を検討することにより評価できると考えられる。結果として肝細胞癌での p21^{waf1} 蛋白の低下が確認され、p21^{waf1} 蛋白発現低下は p53 遺伝子異常による低下に加え、p16^{INK4a} 遺伝子のプロモーター領域のメチル化と密接に関連していた。結論として CDK family 間の相互の関連が *in vivo* で確認され、さらに一方の genome のメチル化により双方の蛋白の低下がもたらされている機構が認められた。また、肝細胞癌では p16^{INK4a} 遺伝子のプロモーター領域のメチル化は高頻度に認められ、背景の非癌部肝においても認められたことより、肝細胞癌の発癌、進展と genome のメチル化の間に密接な関与が推察された。

現在まで肝細胞癌での p16^{INK4a} 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が報告されているが、このメチル化が p21^{waf1} の恒常的な低下に関連し、p53 シグナル経路に影響を与えている可能性が示唆された点で意義深く、また、背景肝におけるメチル化が検討され、発癌に寄与する可能性が推察されており、発癌研究における一つの将来的な課題が提唱されている点で意義深い。また、同時に p53 family である p73, p63 についても広く検討されている。

予備審査で挙げられた問題点としては methylation specific PCR でのメチル化の検討について基礎検討が若干不十分である点と、p21^{waf1}mRNA の real-time PCR において内部コントロールとして現在では不適當と考えられるベータアクチンが用いられ、ベータアクチンの濃度が不揃いであったため、半定量的検討としては信頼性に欠けるとする意見が挙げられた。メチル化については追加実験を行い、p21^{waf1}mRNA については内部コントロールを GAPDH とし、定性的に評価し、一部を改めた。これらの検討により修正された本論文は博士論文に値する。